

Docket No. 211223US0X/hc



#9
MB
06/19/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL, et al.

GAU: 1645

SERIAL NO: 09/938,540

EXAMINER:

FILED: August 27, 2001

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE ccpA1 GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

RECEIVED
JUN 13 2002
TECH CENTER 1600/2900

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

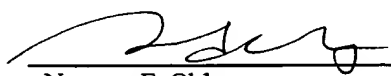
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	100 42 054.0	August 26, 2000
Germany	101 10 052.3	March 2, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Roland E. Martin
Registration No. 48,082



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)



RECEIVED

JUN 13 2002

TECH CENTER 1600/2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 42 054.0

Anmeldetag: 26. August 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Juli 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Sieck

Neue für das ccpAl-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das ccpAl-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des ccpAl-Gens. Das ccpAl-Gen kodiert für das CcpAl-Protein, welches ein Katabolit-Kontroll-Protein A ist.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Werden im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

20 eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

25 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz;

und coryneforme Bakterien, in denen das ccpA1-Gen,
insbesondere durch eine Insertion oder Deletion,
abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im
5 wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen
10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon
enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als
Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in
15 voller Länge zu isolieren, die für das CcpA1-Protein
kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise
Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe
Ähnlichkeit mit der Sequenz des ccpA1-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin
20 als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-
Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann,
die für das CcpA1-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide
enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
25 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende
Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit
einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld
herausgetrennt.

30 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf
Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es
sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte
RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des CcpA1-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das ccpA1-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

- 10 Den Erfindern gelang es, das neue, für das CcpA1-Protein
kodierende ccpA1-Gen von *C. glutamicum*, welches ein
Katabolit-Kontroll-Protein A ist, zu isolieren.

- Zur Isolierung des ccpA1-Gens oder auch anderer Gene von *C.*
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
15 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als
Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone,
Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie,
20 Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von
Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual
(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine
sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes
W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in
25 λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and
General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine
Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des
Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of
the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E.*
30 *coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids
Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al.
(Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum
beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter
Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene
35 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich
5 besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory
10 Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

15 Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten
20 Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

25 Auf diese Weise wurde die neue für das *ccpA1*-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben
beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des
30 entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *ccpA1*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von
5 SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt,
10 die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der
15 Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter
25 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im
30 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten
35 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride

gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide

Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte
5 festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach
Abschwächung des ccpA1-Gens in verbesserter Weise
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die
Expression des ccpA1-Gens oder die katalytischen
10 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder
ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide
Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete
Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)
15 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.
Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise
Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren,
Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und
Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in
20 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy
(Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und
Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei
Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191
(1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),
25 Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999))
und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und
Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
(„Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene
30 und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,
1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der
katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind
aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die

Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinntmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung

(„gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen
5 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder
10 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,
15 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den
20 gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology
25 and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines „cross-over“-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens
30 durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C.
35 glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross-over“-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden „cross-over“-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das *ccpA1*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *ccpA1*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen *eno* (DE: 19947791.4),
- das für das *zwf*-Genprodukt kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),

- gleichzeitig das für die Tetradihydrodipicolinat Succinylase kodierende dapD Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)),
- 5 • gleichzeitig das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)),
- gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)),
- 15 • das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Kalinowski et al. (1990), Molecular and General Genetics 224, 317-324; Accession No.P26512),
- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115),
- 20 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der
25 Abschwächung des ccpA1-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

abzuschwächen.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des ccpA1-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products,
- 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
- 20 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel
- 25 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology„ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,

- 5 Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum
- 10 Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
- 15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
- 20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

- 25 Schließlich können essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen
- 30 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie
- 35 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise

eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei
5 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham
Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-
10 Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche
Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of
Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
30 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in
10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens ccpA1

10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach
20 gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
25 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der
30 Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses
Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm

DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin
5 ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings
10 of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland)
15 verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems
20 (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
25 Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic
30 Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein
35 offenes Leseraster von 1167 bp, welches als ccpA1-Gen

bezeichnet wurde. Das ccpA1-Gen kodiert für ein Polypeptid von 388 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das ccpA1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000059 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1600

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (225)..(1388)

25 <223> ccpA1-Gen

<400> 1

tgggttactg cccaggcaat gtttgatag tttttcgggc ttttatcaac agccaataac 60
 agctcttttcg cccattgagg tggaggggct gttttttcat gccgtaagga aagtgcgaagt 120
 aagtgaaatc aagtggccta gatccattga cacttagact gtgacctagg cttgactttc 180
 gtggggggagt ggggataagt tcactttaaa cacaatgcaa tcga ttg cat tta cgt 236
 Met His Leu Arg
 1

tcc tta tcc cac aat agg ggt acc ttc cag aaa gtt ggt gag gag atg 284
 Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val Gly Glu Glu Met
 5 10 15 20

gct tcc gaa acc tcc agc ccg aag aag cgg gcc acc acg ctc aaa gac 332
 Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr Thr Leu Lys Asp
 25 30 35

atc gcg caa gca aca cag ctt tca gtc agc acg gtg tcc cgg gca ttg 380
 Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val Ser Arg Ala Leu
 40 45 50

gcc aac aac gcg agc att ccg gaa tcc aca cgc atc cga gtg gtt gaa 428
 Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile Arg Val Val Glu
 55 60 65

gcc gct caa aag ctg aac tac cgt ccc aat gcc caa gct cgt goa ttg 476
 Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln Ala Arg Ala Leu
 70 75 80

cgg aag tcg agg aca gac acc atc ggt gtc atc att cca aac att gag 524

	Arg	Lys	Ser	Arg	Thr	Asp	Thr	Ile	Gly	Val	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Glu	
	85					90					95					100	
5	aac	cca	tat	ttc	tcc	tca	cta	gca	gca	tcg	att	caa	aaa	gct	gct	cgt	572
	Asn	Pro	Tyr	Phe	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Ile	Gln	Lys	Ala	Ala	Arg	
					105					110					115		
10	gaa	gct	ggg	gtg	tcc	acc	att	ttg	tcc	aac	tct	gaa	gaa	aac	cca	gag	620
	Glu	Ala	Gly	Val	Ser	Thr	Ile	Leu	Ser	Asn	Ser	Glu	Glu	Asn	Pro	Glu	
				120					125					130			
15	ctg	ctt	ggg	cag	act	ttg	gcg	atc	atg	gat	gac	caa	cgc	ctc	gat	gga	668
	Leu	Leu	Gly	Gln	Thr	Leu	Ala	Ile	Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Asp	Gly	
			135					140					145				
	atc	atc	gtg	gtg	cca	cac	att	cag	tca	gag	gaa	caa	gtc	act	gac	ttg	716
	Ile	Ile	Val	Val	Pro	His	Ile	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Val	Thr	Asp	Leu	
			150				155					160					
20	gtt	aac	agg	gga	gtg	cca	gta	gtg	ctg	gca	gac	cgt	agt	ttt	gtt	aac	764
	Val	Asn	Arg	Gly	Val	Pro	Val	Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Ser	Phe	Val	Asn	
	165					170					175					180	
25	tcg	tct	att	cct	tcg	gtt	acc	tca	gat	cca	gtt	ccg	ggc	atg	act	gaa	812
	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Thr	Ser	Asp	Pro	Val	Pro	Gly	Met	Thr	Glu	
					185					190					195		
30	gct	gtg	gac	tta	ctc	ctg	gca	gct	gac	gtg	caa	ttg	ggc	tac	ctt	gcc	860
	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Asp	Val	Gln	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	
				200					205					210			
35	ggc	ccg	cag	gat	act	tcc	act	ggt	cag	ctg	cgt	ctt	aac	act	ttt	gaa	908
	Gly	Pro	Gln	Asp	Thr	Ser	Thr	Gly	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Thr	Phe	Glu	
			215					220					225				
	aga	cta	tgc	gtg	gac	cgc	ggc	atc	gtc	gga	gca	tct	gtc	tat	tac	ggg	956
	Arg	Leu	Cys	Val	Asp	Arg	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Val	Tyr	Tyr	Gly	
		230					235					240					
40	ggc	tac	cgc	caa	gaa	tct	gga	tat	gac	ggc	atc	aag	gtg	ctg	atc	aag	1004
	Gly	Tyr	Arg	Gln	Glu	Ser	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Ile	Lys	
	245					250				255						260	
45	cag	gga	gcc	aat	gcg	att	atc	gct	ggt	gac	tcc	atg	atg	acc	atc	ggg	1052
	Gln	Gly	Ala	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala	Gly	Asp	Ser	Met	Met	Thr	Ile	Gly	
					265					270					275		
50	gcg	ttg	ttg	gct	ctt	cat	gag	atg	aat	ttg	aag	atc	ggg	gag	gat	gtg	1100
	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	His	Glu	Met	Asn	Leu	Lys	Ile	Gly	Glu	Asp	Val	
				280					285					290			
55	cag	ctc	att	ggg	ttt	gat	aac	aac	cca	att	ttc	cgg	ctg	cag	aat	cca	1148
	Gln	Leu	Ile	Gly	Phe	Asp	Asn	Asn	Pro	Ile	Phe	Arg	Leu	Gln	Asn	Pro	
			295					300					305				
	ccg	ctg	agc	atc	att	gac	cag	cac	gta	caa	gag	atc	ggg	aag	cgt	gcg	1196
	Pro	Leu	Ser	Ile	Ile	Asp	Gln	His	Val	Gln	Glu	Ile	Gly	Lys	Arg	Ala	
		310					315					320					

ttt gag att ctg cag aag ctg atc aat ggg gac acc gcg caa aaa tct 1244
 Phe Glu Ile Leu Gln Lys Leu Ile Asn Gly Asp Thr Ala Gln Lys Ser
 325 330 335 340

5 gtg gtg att cca acg cag ctc agc atc aat gga tca acg gcg gtt tcc 1292
 Val Val Ile Pro Thr Gln Leu Ser Ile Asn Gly Ser Thr Ala Val Ser
 345 350 355

10 caa aag gcg gcc gca aag gca gca aaa gca gcc caa aaa gca gcc gcg 1340
 Gln Lys Ala Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Ala Gln Lys Ala Ala Ala
 360 365 370

15 aaa gcc gca cag aac acg caa cac gag gtg agc cta gat ggt gaa ctc 1388
 Lys Ala Ala Gln Asn Thr Gln His Glu Val Ser Leu Asp Gly Glu Leu
 375 380 385

tgaacaagcg cttcatcagc atgatactgc accaatcctt cagttggata aagtctccaa 1448
 gtcgtttggc ccagtcaacg tcattaatca agtgagcatc gatgttcgcc ctggcagggg 1508
 gcttgcgctg ttgggtgaaa atggtgcggg taaatctacg ctgatcaaga tgatgtcggg 1568
 tgtgtatcag cctgatggcg ggcagatttt gg 1600

25 <210> 2
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <400> 2
 Met His Leu Arg Ser Leu Ser His Asn Arg Gly Thr Phe Gln Lys Val
 1 5 10 15

35 Gly Glu Glu Met Ala Ser Glu Thr Ser Ser Pro Lys Lys Arg Ala Thr
 20 25 30

40 Thr Leu Lys Asp Ile Ala Gln Ala Thr Gln Leu Ser Val Ser Thr Val
 35 40 45

45 Ser Arg Ala Leu Ala Asn Asn Ala Ser Ile Pro Glu Ser Thr Arg Ile
 50 55 60

45 Arg Val Val Glu Ala Ala Gln Lys Leu Asn Tyr Arg Pro Asn Ala Gln
 65 70 75 80

Ala Arg Ala Leu Arg Lys Ser Arg Thr Asp Thr Ile Gly Val Ile Ile
 85 90 95

50 Pro Asn Ile Glu Asn Pro Tyr Phe Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ile Gln
 100 105 110

55 Lys Ala Ala Arg Glu Ala Gly Val Ser Thr Ile Leu Ser Asn Ser Glu
 115 120 125

Glu Asn Pro Glu Leu Leu Gly Gln Thr Leu Ala Ile Met Asp Asp Gln
 130 135 140

Arg Leu Asp Gly Ile Ile Val Val Pro His Ile Gln Ser Glu Glu Gln

	145		150		155		160
	Val Thr Asp Leu	Val Asn Arg Gly	Val Pro Val Val Leu	Ala Asp Arg			
		165		170		175	
5	Ser Phe Val Asn	Ser Ser Ile Pro	Ser Val Thr Ser	Asp Pro Val Pro			
		180	185		190		
10	Gly Met Thr Glu	Ala Val Asp Leu	Leu Leu Ala Ala	Asp Val Gln Leu			
		195	200	205			
	Gly Tyr Leu Ala	Gly Pro Gln Asp	Thr Ser Thr Gly	Gln Leu Arg Leu			
		210	215	220			
15	Asn Thr Phe Glu	Arg Leu Cys Val	Asp Arg Gly Ile	Val Gly Ala Ser			
		225	230	235		240	
	Val Tyr Tyr Gly	Gly Tyr Arg Gln	Glu Ser Gly Tyr	Asp Gly Ile Lys			
		245	250	255			
20	Val Leu Ile Lys	Gln Gly Ala Asn	Ala Ile Ile Ala	Gly Asp Ser Met			
		260	265	270			
	Met Thr Ile Gly	Ala Leu Leu Ala	Leu His Glu Met	Asn Leu Lys Ile			
25		275	280	285			
	Gly Glu Asp Val	Gln Leu Ile Gly	Phe Asp Asn Asn	Pro Ile Phe Arg			
		290	295	300			
30	Leu Gln Asn Pro	Pro Leu Ser Ile	Ile Asp Gln His	Val Gln Glu Ile			
		305	310	315		320	
	Gly Lys Arg Ala	Phe Glu Ile Leu	Gln Lys Leu Ile	Asn Gly Asp Thr			
		325	330	335			
35	Ala Gln Lys Ser	Val Val Ile Pro	Thr Gln Leu Ser	Ile Asn Gly Ser			
		340	345	350			
	Thr Ala Val Ser	Gln Lys Ala Ala	Ala Lys Ala Ala	Lys Ala Ala Gln			
40		355	360	365			
	Lys Ala Ala Ala	Lys Ala Ala Gln	Asn Thr Gln His	Glu Val Ser Leu			
		370	375	380			
45	Asp Gly Glu Leu						
	385						

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ccpA1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Katabolit-Kontroll-Proteins CcpA1 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das ccpA1-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das ccpA1-Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression
des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das ccpA1-
Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere
5 ausschaltet.
12. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
herabsetzt, für das das Polynukleotid ccpA1 kodiert.
- 10 13. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man für die
Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15 13.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 13.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 13.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 13.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende
20 Gen pyc,
- 13.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 13.6 gleichzeitig das für die Tetradihydrodipicolinat
Succinylase kodierende dapD Gen,
- 25 13.7 gleichzeitig das Gen für die
Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende
dapE Gen,
- 13.8 gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 13.9 gleichzeitig das für die Malat:Chinon
30 Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,

- 13.10 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 13.11 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
- 5 14. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 10 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
- 15 abschwächt.
15. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 20 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt.
- 25 17. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für das Katabolit-Kontroll-Protein CcpA1 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *ccpA1*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungs sonden einsetzt.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass die Hybridisierung unter einer Stringenz
entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das ccpA1-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.